

微波辅助提取水牛角的工艺研究

邓愍氏 李进进 武卉

(江西国药有限责任公司药物研究所 南昌 330052)

摘要:目的:优选水牛角的最佳提取工艺。方法:以水牛角中 16 种氨基酸的提取率为考察指标,采用正交试验考察了 4 种因素(溶剂用量、辐射时间、微波功率、浸泡时间)对提取结果的影响。结果:正交试验考察优化的结果为采用去离子水作润湿剂,润湿 8h,水提时水与水牛角比为 20:1,辐射时间 15min,微波功率:560W。结论:与传统方法相比,微波辅助萃取能大大节省提取时间并提高提取率。

关键词:微波技术;水牛角;氨基酸;提取工艺

中图分类号:R 282.740.2

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2007)05-0080-02

水牛角为牛科动物水牛(*Bubalus bualis* L)的角,其有效成分主要为胆甾醇、丙氨酸、精氨酸、天冬门氨酸、胱氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、组氨酸、缬氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、多肽、胍及蛋白质^{〔1〕}。水牛角具有清热解毒、凉血、定惊之功效,用于治疗温病高热、神昏谵语、发斑发疹、吐血衄血、惊风、癫狂等症^{〔2〕}。因其成分与犀角大同小异,可作为犀角的代用品用于抗内毒素中毒、抗内毒素引起的弥漫性血管内凝血(DIC)等症^{〔3〕}。

微波是一种频率在 300MHz~300GHz 之间的电磁波。物料吸收微波能后通过偶极电子旋转和离子传导两种方式由内向外同时加热,使萃取物质的细胞内部温度迅速上升,导致细胞壁破裂,从而使胞内成分在较低温度下被萃取介质捕获并溶解^{〔4〕}。微波辅助提取技术(microwave-assisted extraction)是微波与传统的溶剂萃取法相结合后形成的一种新的萃取方法。Ganzler^{〔5〕}首先在分析化学制样技术中应用微波萃取方法。微波辅助提取以其快速、高效、安全、节能、环保等特点,在中药行业中日益引起人们的关注^{〔6-9〕}。

1 仪器与试剂

微波萃取试验台(NJC03-1 型,南京杰全微波设备有限公司),具有冷凝回流及鼓泡搅拌装置;高速粉碎机(SF-170-3 型,上海中药机械厂);Agilent1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);Sartorius(BS224S 型)电子称(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。水为去离子水(江西国药有限责任公司

表 2 金边瑞香提取物中瑞香素的含量测定 %			
实验号	瑞香萃取率	瑞香素含量	瑞香素总萃取量
1	2.03	11.76	1.537
2	2.15	11.24	1.320
3	2.52	11.64	1.591
4	1.85	11.92	1.426
5	1.92	11.35	1.085
6	2.18	11.23	1.079
7	1.35	11.19	1.026

将有关实验的水平数均匀分散在实验范围内,使实验次数与水平数相等,减少了多次实验,且实验结果可用计算机处理,通过回归方程得出最佳实验条件,是一种值得推广的实验设计方法^{〔4〕}。对于本实验,可考虑将 4 个因素的相关实验范围各等分为 7 个水平,做 7 次有关的实验即可筛出最佳条件;而正交设计的特点是考虑将实验因素整齐可比,其实验次数是实验水平的平方,比均匀设计要多^{〔5〕}。

本实验在预实验时将萃取压力提高到 30MPa,结果压力大于 20MPa 以上萃取率降低,本实验表 1 结果也和预实验

制剂车间提供),无水乙醇(AR),邻苯二甲醛(AR),β- 巯基乙醇(AR),甲醇(色谱纯),磷酸氢二钾(AR),磷酸二氢钾(AR),乙酸钠(AR),磷酸(优级纯),四氢呋喃(THF)(AR),氨基酸标准品:苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、胱氨酸(Cys)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Try)、丙氨酸(Ala)(均购自江西省食品药品检验所),水牛角(购自江西南华医药公司,经南昌市食品药品检验所鉴定为牛科动物水牛的角)。

2 方法与结果

2.1 提取工艺 将水牛角镑片用粉碎机打碎,过 100 目筛,天平称量每 50g 一组,加入适量去离子水润湿一定时间后,装入三口烧瓶中,加入适量去离子水,放入微波炉中微波辐射一定时间后取出,趁热过滤,滤液蒸馏,至蒸馏液剩余约 40mL,加无水乙醇至 200mL,静置 24h,过滤,定容,取少量用 RP-HPLC 法分析产品中氨基酸含量。剩余溶液减压蒸馏至干,得到含多种氨基酸的浸膏。

2.2 柱前衍生反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析氨基酸

2.2.1 色谱条件 HP Hypersil ODS 柱(125mm× 4.6mm× 5 μm),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。流动相 A:8.0mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH7.2),含 φ=0.3%四氢呋喃;流动相 B:8.0mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2)+ 甲醇+ 乙腈(50+35+15)。线性梯度洗脱,柱温 35℃,流速为 1.0mL/min;的结果一致,这可能和金边瑞香药材中的成分和性质有关。超临界 CO₂ 流体萃取是用无毒、不残留的 CO₂ 代替水或有机溶剂萃取介质并在接近室温的条件下萃取,只要简单地改变温度或压力就可使溶质在 CO₂ 中的溶解度发生很大的改变,在萃取后可对各组分进行分离而获得高质量的提取物,从而为高选择性萃取提供了可能。

参考文献

[1]张忠义,邹恒琴,黄昌全,等.超临界流体提取技术在中药化学成分研究中的应用[J].中成药,1997,19(1):45~47
[2]苏子仁,雷正杰,曾健青,等.超临界 CO₂ 在厚朴提取工艺中的应用[J].中国中药杂志,2001,26(1):31~33
[3]林亚平.中药制剂试验设计中要注意的若干问题[J].中国中药杂志,2001,26(9):579~581
[4]林亚平.中药制剂均匀试验设计微机软件的研制与应用[J].中国中药杂志,1995,20(8):473~475
[5]魏毅,罗杰英.用多指标试验全概率评分法研究茶多酚颗粒制备工艺[J].中国中药杂志,1999,24(5):279~281

(收稿日期:2007-04-24)

荧光检测器激发波长 $E_x=340\text{nm}$, 发射波长 $E_m=450\text{nm}$ 。进样量为 $20\mu\text{L}$, 峰面积定量。

2.2.2 衍生化试剂的配制 称取邻苯二甲醛 0.0500g , 用 1mL 甲醇溶解, 加入 $100\mu\text{L}$ 巯基乙醇, 用 0.4mol/L 硼酸溶液 ($\text{pH}=9.5$, 氢氧化钠溶液调制) 定容至 10mL , 混匀, 放入棕色瓶中, 置 4°C 冰箱备用。

2.2.3 16 种氨基酸标准溶液 精密称取丙氨酸等 16 种氨基酸对照品, 加甲醇制成 0.1mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密移取对照品溶液 (柱前衍生: 移取 $50\mu\text{L}$ 样品或标准溶液于容积为 1mL 的小试管中, 加入 $25\mu\text{L}$ 衍生化试剂, 充分搅拌, 等待 1.5min), 稀释成质量浓度分别为 0.050 、 0.025 、 0.013 、 0.006mg/mL , 进行测定。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得到标准曲线方程: Cys: $Y=2.45X+0.032$, $r=0.9971$; Pro: $Y=2.16X-0.025$, $r=0.9988$; Try: $Y=1.53X-0.066$, $r=0.9978$; Ala: $Y=3.28X-0.053$, $r=0.9997$; Asp: $Y=7.46X-0.008$, $r=0.9991$; Glu: $Y=6.01X+0.005$, $r=0.9989$; Ser: $Y=9.08X+0.024$, $r=0.9983$; His: $Y=2.13X-0.018$, $r=0.9989$; Gly: $Y=10.32X-0.012$, $r=0.9987$; Met: $Y=4.62X+0.015$, $r=0.9985$; Arg: $Y=4.32X+0.010$, $r=0.9991$; Val: $Y=6.73X+0.024$, $r=0.9997$; Ile: $Y=7.45X+0.007$, $r=0.9992$; Phe: $Y=1.71X-0.132$, $r=0.9980$; Leu: $Y=3.82X+0.018$, $r=0.9989$; Lys: $Y=1.86X+0.005$, $r=0.9988$ 。 ($Y=Y_0\times 10^{-6}$)。

2.2.5 氨基酸的测定 将样品溶液进行 RP-HPLC 分析, RP-HPLC 图上的氨基酸峰面积代入标准曲线方程, 计算产品中氨基酸的量。

2.3 水牛角中氨基酸的测定 采用 RP-HPLC 法测定水牛角中氨基酸, 结果水牛角中氨基酸的质量分数为 19.30% 。

2.4 提取率的计算 氨基酸的提取率 = 干浸膏中氨基酸的质量 / 水牛角中氨基酸的总质量。

2.5 正交设计试验结果与分析 准确称取水牛角, 每份 50g , 按 $L_{16}(4^4)$ 正交表设计方案进行试验, 讨论去离子水用量 (A)、辐射时间 (B)、微波功率 (C) 及润湿时间 (D) 对萃取结果的影响。因素水平见表 1, 实验结果及极差分析见表 2。

表 1 因素和水平

水平	因素			
	A/mL	B/min	C/W	D/h
1	500	10	320	2
2	800	15	400	5
3	1000	20	480	8
4	1200	30	560	11

由 R 值可知, 各因素对试验结果的重要次序为: $C>B>D>A$, 微波功率对总氨基酸得率有显著影响, 溶剂用量对总氨基酸得率影响较小。综合各种因素, 选定水牛角提取 (上接第 78 页) 术后第 2 天, 去石膏托, 指导病人用手掌置健肢正前方、腘上 10cm , 作股四头肌收缩, 每收缩一次, 感腘骨上移, 待病人有体会后, 即嘱作患肢股四头肌收缩, 每日练 $20\sim 30$ 次。(2) 股四头肌等长运动: 术后第 3 天, 病人仰卧, 嘱患膝尽量采伸直位, 抬高患肢 $30\sim 40\text{cm}$, 令股四头肌收缩, 每次 $3\sim 4\text{min}$, 每日 $10\sim 20$ 次。(3) 主动活动膝关节: 术后第 4~5 天, 病人仰卧位, 屈患髋关节, 以健肢或抬或压患肢, 从而令患膝作屈伸运动, 每日 $10\sim 30$ 次, 每次 $3\sim 5\text{min}$, 循序渐进, 每日加大一点屈伸活动度。拆线后, 可于患肢腘窝部, 置薄枕

工艺为 $A_3B_2C_4D_3$ 。

表 2 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	提取率 /%
1	1	1	1	1	54.12
2	1	2	2	2	80.63
3	1	3	3	3	87.52
4	1	4	4	4	78.81
5	2	1	2	3	77.92
6	2	2	3	4	94.52
7	2	3	4	1	84.12
8	2	4	1	2	83.94
9	3	1	3	4	61.35
10	3	2	4	3	97.13
11	3	3	1	2	80.45
12	3	4	2	1	77.12
13	4	1	4	2	84.98
14	4	2	1	1	69.78
15	4	3	2	4	71.77
16	4	4	3	3	62.85
K1	301.08	278.37	258.29	285.23	
K2	310.50	342.06	307.53	300.00	
K3	316.14	323.86	306.24	325.42	
K4	289.38	272.81	345.05	306.45	
极差 R	26.76	69.25	86.75	40.19	
较优水平	3	2	4	3	

2.6 工艺验证试验 为考察上述优选提取工艺的稳定性, 按该工艺条件进行重复试验 3 次, 测定水牛角总氨基酸的得率, 结果总氨基酸平均得率为 96.78% , RSD 为 2.31% 。表明本试验制定的工艺路线稳定可靠。

3 结论

本实验在微波辐射条件下, 通过正交试验法对水牛角的提取工艺条件进行了优化, 并按最佳工艺进行了验证试验。结果表明: 微波辅助提取水牛角中的总氨基酸具有更快萃取速率, 有效物质更易溶出, 工艺简单, 提取率高, 稳定性好, 适用于工业化生产。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 522
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [S]. 2005 年版. 北京: 化学工业出版社, 2005. 56
[3] 金若敏, 陈长勋, 范广平, 等. 犀角与水牛角药理作用研究 [J]. 中成药, 1997, 19 (7): 33~34
[4] 梅成. 微波萃取技术的应用 [J]. 中成药, 2002, 24 (2): 134~135
[5] Ganzler K, Salgo A, Valko K. microwave extraction-a novle sample preparation method for chromatography [J]. Journal of hromatography, 1986, 371: 299~306
[6] 王艳, 张铁军. 微波萃取技术在中药有效成份中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36 (3): 470~473
[7] 谢正礼, 徐世荣, 吴云鹏. 微波辅助提取技术及其在中药研究中的应用 [J]. 中成药, 2005, 27 (11): 1 326~1 329
[8] 李杰红. 微波辅助萃取技术提取中药有效成分研究 [J]. 中国医药导报, 2006, 3 (36): 155~156
[9] 沈岚, 冯年平, 韩朝阳, 等. 微波萃取对不同形态结构中中药及含不同极性成分中药的选择性研究 [J]. 中草药, 2002, 33 (7): 604~607

(收稿日期: 2007-04-12)

(逐日增加垫枕高度), 仍循前述方法, 压或抬患肢, 增大膝关节活动度, 逐步达最大屈伸活动度。

2.3.2 被动活动 术后第 4~5 天, 必要时医护人员双手持患肢膝关节上下方, 逐步展开膝关节的屈伸活动度, 每日增加一点, 拆线后增大活动度, 直至达最大值。锻炼的过程疼痛是难免的, 必要时辅以止痛剂, 力争 $3\sim 6$ 个月患膝活动度达 $> 90^\circ$, 越晚锻炼, 由于再粘连, 越难活动开膝关节。活动时切忌粗暴, 以防损伤。

(收稿日期: 2007-01-11)